

## イオントホレーゼによる家兎眼への遺伝子導入

浅原 貴志, 四宮 加容, 内藤 毅, 塩田 洋

徳島大学医学部眼科学教室

## 要 約

**目 的:** イオントホレーゼにより白色家兎眼に 6-carboxyfluorescein (6-FAM) で標識したホスホロチオエート型のオリゴヌクレオチド (S オリゴ) を非侵襲的に導入し、眼組織への移行、安定性、眼組織障害の有無について検討する。また、プラスミドの眼組織への導入についても検討を加える。

**対象と方法:** 白色家兎はイオントホレーゼ群 6 匹 12 眼、対照群 2 匹 4 眼を用いた。対照群には点眼で投与した。イオントホレーゼ後、前房水、硝子体液を採取し、蛍光 DNA シーケンサで泳動し、Gene Scan プログラムで解析した。また、厚さ 10  $\mu$ m の凍結切片を作製して蛍光顕微鏡で観察した。Green fluorescent protein (GFP) を発現する、大きさ 4.7 kbp のプラスミドを同様の方法で家兎 9 匹 18 眼に導入した。

**結 果:** イオントホレーゼ群では通電後 5 分で前房中から、10 分で硝子体中から S オリゴを検出した。それらは合成時の長さを保っていた。また、通電後 20 分で後極部網膜組織中からも S オリゴを検出できた。眼組織に変性所見や炎症所見などはなかった。プラスミドを導入したものでは、角膜、隅角、毛様体上皮組織に GFP 遺伝子発現を示す蛍光があった。

**結 論:** イオントホレーゼは家兎眼組織内遺伝子導入法として有用であると考えられた。(日眼会誌 103: 178-185, 1999)

**キーワード:** イオントホレーゼ, ホスホロチオエート型オリゴヌクレオチド, Green fluorescent protein

## Induction of Genes into the Rabbit Eye by Iontophoresis

Takashi Asahara, Kayo Shinomiya, Takeshi Naito and Hiroshi Shiota

Department of Ophthalmology, The University of Tokushima School of Medicine

## Abstract

**Purpose:** After inducing 6-carboxyfluorescein (6-FAM)-labeled phosphorothioate oligonucleotides (S-ODNs) noninvasively into albino rabbit eyes by iontophoresis, we assessed the transfer of S-ODNs into the ocular tissues, their stability, and the possible presence of injury to the ocular tissues.

**Methods:** The iontophoresis group consisted of 12 eyes of 6 rabbits and the control group consisted of 4 eyes of 2 rabbits given eye drops containing S-ODNs. Aqueous humor and vitreous humor were collected after iontophoresis, subjected to electrophoresis with a fluorescent DNA sequencer and analyzed by the Gene Scan program. Frozen sections at 10  $\mu$ m were prepared for observations under a fluorescent microscope. A plasmid 4.7 kbp in size that expresses green fluorescent protein (GFP) was induced into 18 eyes of 9 rabbits by the same procedure.

**Results:** In the iontophoresis group, S-ODNs

were detected in the anterior chamber 5 minutes after electrophoresis and in the vitreous 10 minutes after. These S-ODNs maintained the same length as at the initial synthesis. S-ODNs could also be detected in the posterior retina 20 minutes after electrophoresis. No evidence of degeneration or inflammation due to the above procedure was found in the ocular tissues. Fluorescence showing GFP gene expressions were found in the cornea, the anterior chamber angle, and the ciliary subepithelial tissues.

**Conclusions:** These findings show that iontophoresis is an effective method to induce gene into rabbit eyes. (Jpn Ophthalmol Soc 103: 178-185, 1999)

**Key words:** Iontophoresis, Phosphorothioate oligonucleotide, Green fluorescent protein

別刷請求先: 770-8503 徳島市蔵本町 3-18-15 徳島大学医学部眼科学教室 浅原 貴志

(平成 10 年 4 月 8 日受付, 平成 10 年 9 月 11 日改訂受理)

Reprint requests to: Takashi Asahara, M.D. Department of Ophthalmology, The University of Tokushima School of Medicine, 3-18-15 Kuramoto-cho, Tokushima 770-8503, Japan

(Received April 8, 1998 and accepted in revised form September 11, 1998)

## I 緒 言

アンチセンスオリゴデオキシヌクレオチドの投与により標的遺伝子の発現を調節するアンチセンス療法では、オリゴヌクレオチドの組織への高い導入効率と組織内における安定性が重要である。細胞に遺伝子を導入する方法としては、各種ウイルスベクターをはじめとして種々の方法が開発されている<sup>1)~5)</sup>が、遺伝子導入効率や組織に対する安全性などの点から決定的なものがないのが現状である。また、組織内でオリゴヌクレオチドを安定化させる方法として、磷酸部位を硫化剤で修飾して、ホスホチオエート型(Sオリゴ)とする方法があり、細胞に取り込まれやすく、生体内酵素による加水分解を受けにくいことから注目されている<sup>6)~9)</sup>。

本研究では、イオントホレーゼにより家兎眼に蛍光標識したSオリゴを非侵襲的に投与し、網膜組織など眼組織への移行、眼球内での安定性、眼組織障害の有無を検討した。また、外来遺伝子を組み込むためのプラスミドの導入にも本方法を用いて若干の知見を得たので報告する。

## II 実験方法

### 1. 蛍光標識Sオリゴの作製および検出法

ヒトアルドース還元酵素のメッセンジャーRNA(mRNA)のアンチセンス配列23塩基である(TACCG-CTCGGTAGATTCTGAGTT)を自動合成機(Applied Biosystems 社, 392 DNA/RNA Synthesizer)で合成した。この配列を用いたのは、現在我々がヒトアルドースレ

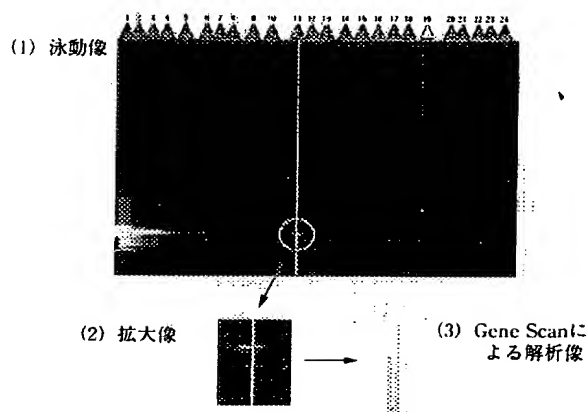


図1 使用したホスホチオエート型オリゴヌクレオチド(Sオリゴ)の泳動像および解析像。

蛍光DNAシーケンサにおける泳動像を(1)に示す。11レーンに泳動されたSオリゴをscanしたところ、極端に短いものや遊離蛍光はよく除去されている。(2)は泳動されたSオリゴの拡大像。Gene Scanプログラムでの解析像を(3)に示す。Sオリゴの塩基数および量に応じた波形が抽出される。Sオリゴは他の修飾オリゴと異なり、立体異性体になりやすく、高度精製後であるが3つの波が検出されている。

クターゼを発現するトランスジェニックマウスを遺伝子発現抑制の実験に用いているためである。自動合成の酸化をテトラエチルチラムジスルフィドによる硫黄化に変更し、全塩基を修飾した。さらに、フルオレセインを用いた標識化剤である6-carboxyfluorescein(6-FAM)を最終サイクルに用いて5'末端標識を行った。これを最後に逆相 high performance liquid chromatography (HPLC)で精製し、遊離蛍光の除去と最長のオリゴの精製を行った。精製した蛍光標識Sオリゴを蛍光DNAシーケンサで泳動して泳動像から精製度を確認したところ、遊離蛍光や極端に短いオリゴはよく除去されていた。図1に硝子体液および房水中から抽出した蛍光標識Sオリ

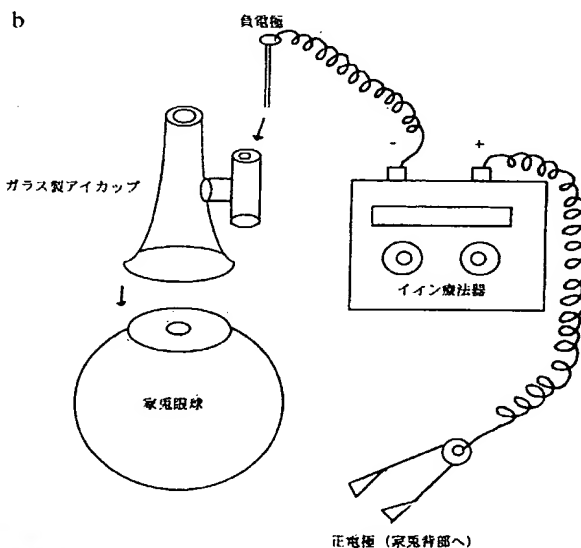


図2 イオントホレーゼによる白色家兎眼への遺伝子導入法。

(a)はんだや製伊東式イオン療法器を用い、家兎角膜上に負電極をつないだガラス製のアイカップを置いて2 mlのSオリゴおよびプラスミド溶解液を注入後、近傍の背部に正電極をつなぎ、循環器系に与える影響を最小にするため徐々に通電しながら平均2分間で1.5 mAとした。1.5 mAに達してから時間の時間を通電時間とした。電源は100 V 交流電源。

(b)実験方法のシェーマを示す。

ゴを電気泳動し、蛍光 DNA シーケンサ(パーキンエルマー社, 377 型)により泳動画像化したもの、および Gene Scan プログラムの解析像を示す。検出波長の中心は 532 nm である。S オリゴは他の修飾オリゴと異なり、立体異性体となりやすく、検出波長には 3 つのピークがあった。

## 2. イオントホレーゼによる家兎眼への導入および検出

使用したイオントホレーゼ機器は、はんだや製の伊東式イオン療法器である。核酸が負に帯電していることを利用し、眼内に向かう電流によって移行することをねらった。実験動物はニュージーランド種白色家兎(雌、体重 2.0~3.0 kg)を用いた。蛍光標識した S オリゴを人工房水(BSS プラス<sup>®</sup>, 参天製薬)に溶解し 10 pmol/ $\mu$ l とした。次に、家兎を塩酸ケタミン(ケタラール<sup>®</sup>, 35 mg/kg)とキシラジン塩酸塩(セラクタール<sup>®</sup>, 10 mg/kg)の等量混合液の筋肉注射により全身麻酔した後、角膜上に負電極をつないだガラス製のアイカップを置いて 2 ml の溶解液を注入後、近傍の背部に正電極をつなぎ、循環器系に与える影響を最小限にするため徐々に通電しながら、平均で 2 分間をかけて 1.5 mA とした(図 2)。電源は 100 V の交流電源を使用した。1.5 mA に達した後、5 分間、10 分間、20 分間の 3 種類の通電時間でイオントホレーゼを行い、通電終了後直ちに十分量のペントバルビタールナトリウム(ネンプタール<sup>®</sup>, 50 mg/ml)による静脈麻酔で家兎を安楽死させ、眼球を摘出した。さらに、生理食塩水で摘出眼球を十分に洗浄し、付着した S オリゴ溶解液を除去し、速やかに前房水、硝子体液を採取した。これを 1 レーン当たり 3  $\mu$ l ずつ蛍光 DNA シーケンサで泳動し、Gene Scan プログラムで解析した。各々の通電時間につき白色家兎 2 匹 4 眼を用いて実験を行い、別々に解析し再現性を確認した。さらに、眼組織への導入について検討

するため、厚さ 10  $\mu$ m の凍結切片を作製し、オリンパス社製落射型蛍光顕微鏡で観察した。対照として、家兎 2 匹 4 眼に 20 分おきに 3 回同濃度の S オリゴ溶解液を点眼し、イオントホレーゼを行わず、20 分後に同様に家兎を安楽死させた後、速やかに前房水、硝子体液を採取し、さらに凍結切片を作製して比較検討した。

## 3. 眼組織障害の検討

蛍光無標識の S オリゴを同様にイオントホレーゼにより白色家兎眼に導入後、4 日目および 7 日目に眼球を摘出し、厚さ 10  $\mu$ m の凍結切片を作製し、眼組織のヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し検討した。

## 4. イオントホレーゼによる眼組織へのプラスミド導入の試み

プラスミドは、サイトメガロウイルスのプロモーターで green fluorescent protein (GFP) を発現するものを用いた(pEGFP-N1, CLONTECH 社)。その大きさは 4.7 kbp であり、発現した場合、紫外線照射で蛍光を発する。この発光は他の bioluminescent reporter と異なり、他に蛋白質や基質、cofactor などを必要としない特徴がある。

このプラスミドを 0.5  $\mu$ g/ml, 5  $\mu$ g/ml, 50  $\mu$ g/ml の 3 種類の濃度に調整し、各々 2 ml を家兎角膜上に設置したアイカップに注入し、それぞれの濃度について 10 分間、20 分間、30 分間通電して比較した。各々の条件について家兎 1 匹 2 眼球ずつ合計 9 匹 18 眼を用いた。通電後 4 日目に十分量のペントバルビタールナトリウム(ネンプタール<sup>®</sup>)による静脈麻酔で家兎を安楽死させ、眼球を摘出し、生理食塩水で眼球を洗浄し、厚さ 10  $\mu$ m の凍結切片を作製して、蛍光顕微鏡で観察した。さらに、同じ厚さの切片からヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、眼組織障害の有無について検討した。対照として、家兎 2 匹 4 眼に 50  $\mu$ g/ml のプラスミド溶液を 20 分おきに

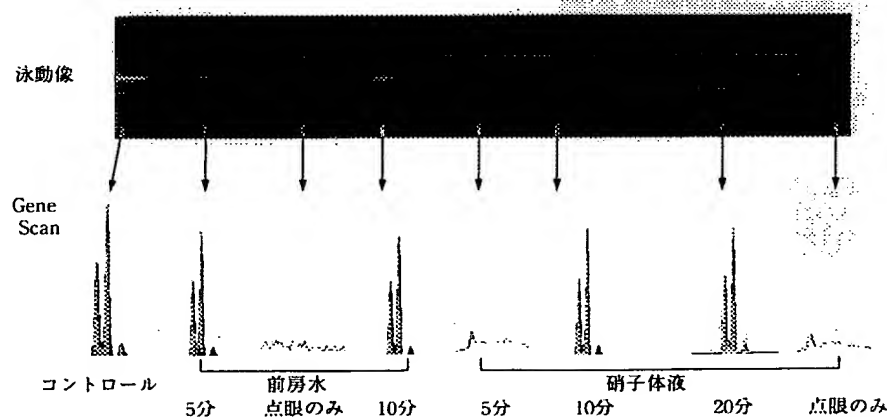


図3 イオントホレーゼ後の前房水および硝子体液中からの S オリゴの検出。

蛍光標識 S オリゴをイオントホレーゼにより家兎眼に導入開始後、5 分で前房水中に、10 分で硝子体液中にその存在を確認した。また、示された DNA シーケンサの泳動像から、眼内から検出された S オリゴは対照のものと同じ分子レベルにある。また、Gene Scan の解析像も同様の波形が得られている。20 分おきに 3 回 S オリゴ溶解液を点眼したものでは、眼内から S オリゴは検出されていない。マーカーは 200 b を示す。

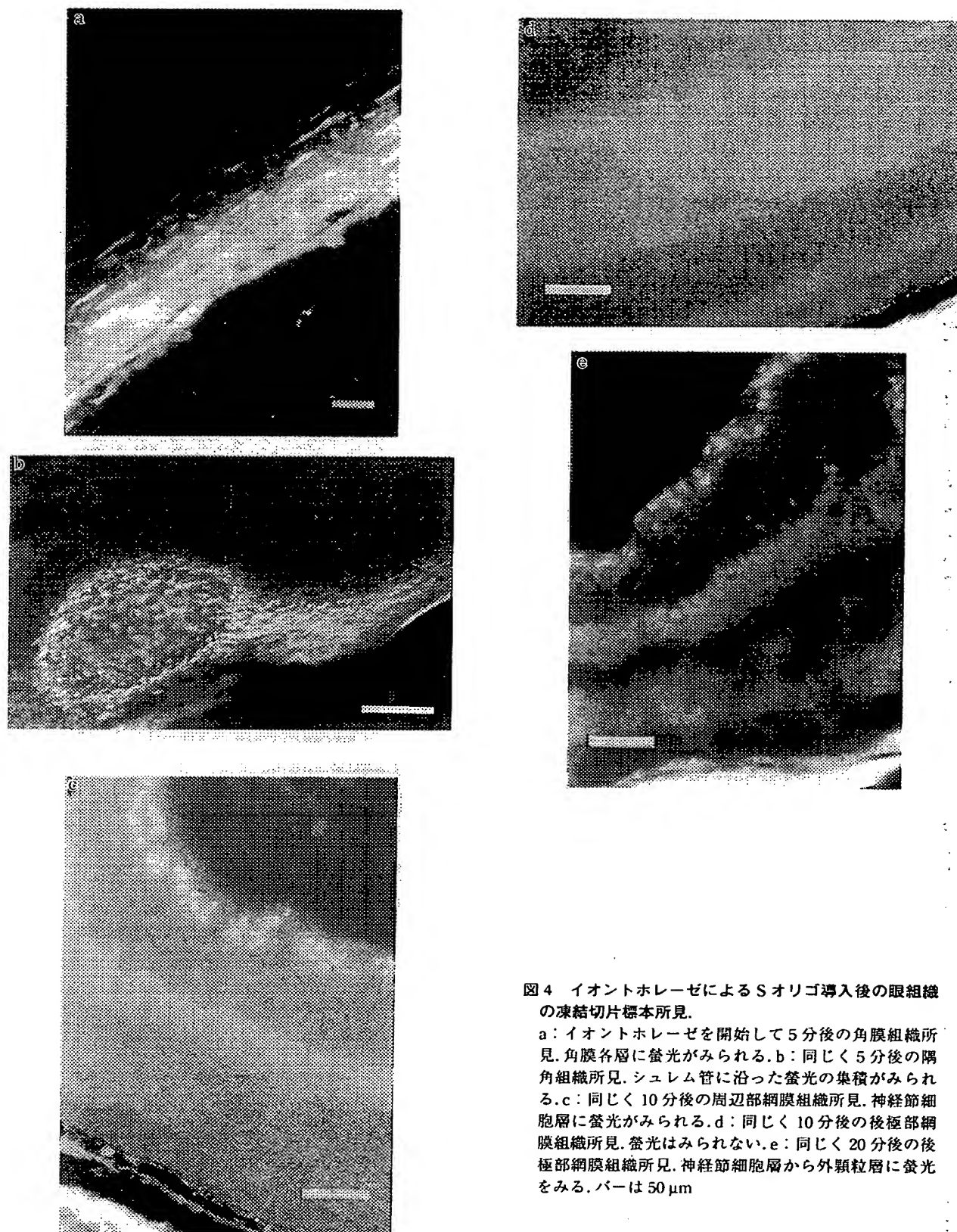


図4 イオントホレーゼによるSオリゴ導入後の眼組織の凍結切片標本所見.

a: イオントホレーゼを開始して5分後の角膜組織所見. 角膜各層に蛍光がみられる. b: 同じく5分後の隅角組織所見. シュレム管に沿った蛍光の集積がみられる. c: 同じく10分後の周辺部網膜組織所見. 神経節細胞層に蛍光がみられる. d: 同じく10分後の後極部網膜組織所見. 蛍光はみられない. e: 同じく20分後の後極部網膜組織所見. 神経節細胞層から外顆粒層に蛍光をみる. バーは50  $\mu$ m

3 回点眼し、イオントホレーゼを行わず、4 日目に家兎を同様に安楽死させ、眼球を摘出し厚さ 10  $\mu\text{m}$  の凍結切片を作製して蛍光顕微鏡で観察した。

### III 結 果

蛍光標識 S オリゴをイオントホレーゼにより家兎眼に導入後、5 分間の通電で前房水中に蛍光標識された S オリゴを確認できた。硝子体液中には、5 分間の通電では S オリゴの蛍光を確認できなかったが、10 分間の通電で同様に確認できた(図 3)。また、示された DNA シーケンスの泳動像から、眼内から検出された S オリゴは対照のものと同じ分子量レベルにあり、Gene Scan による解析波形も同様のものが得られた。また、20 分おきに 3 回 S オリゴ溶解液を点眼し、イオントホレーゼを行わなかったものでは眼内から S オリゴは検出されなかった。

同様に、S オリゴを白色家兎眼球に導入 5 分後の角膜および隅角の凍結切片所見を図 4 に示す。角膜各層に強い蛍光があり、隅角ではシュレム管周囲組織に強い蛍光をみている。また、網膜組織においては、10 分間の通電で周辺部網膜まで、20 分間の通電で後極部網膜深層まで S オリゴの存在を示す蛍光を確認できた。点眼投与群では、いずれの眼組織にも蛍光はみられなかった。

イオントホレーゼによって S オリゴを眼球に導入した後も、細隙灯による観察では家兎角膜は透明性を維持し、浮腫はなかった。4、7 日目の眼組織のヘマトキシリン・エオジン染色所見においても、眼組織に変性所見や炎症所見は全くなかった。

イオントホレーゼによりプラスミドを導入した眼球の凍結切片においては、5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度以上で 20 分間以上通電した群の眼球の凍結切片において角膜、隅角、毛様体上皮下組織に GFP 遺伝子発現を示す蛍光があった。蛍光強度は、通電時間が長く濃度の高いものが強くなる傾向があるが、明らかな差はなかった。強膜組織にも比較的多くの蛍光があったが、自発蛍光も強くみられるため、GFP の蛍光と区別し難かった。網膜組織にはすべての群で明らかな蛍光はなかった(図 5)。点眼投与群ではいずれの眼組織にも蛍光はみられなかった。

### IV 考 按

アンチセンス療法は標的遺伝子に相補的な配列を持つ DNA 断片(アンチセンスオリゴヌクレオチド)を投与し、標的遺伝子の発現を調節する広義の遺伝子治療である。この方法においては、オリゴヌクレオチドを始めとした外来遺伝子の細胞中への高い導入効率と導入後の安定性が問題となる。オリゴヌクレオチドやプラスミドなどの外来遺伝子を細胞に導入する方法としては、各種ウイルスベクターを用いる方法やリポソームを用いる方法など種々の方法が開発されている。レトロウイルスベクターは長い研究、改良の歴史があり、既に人に対する治療

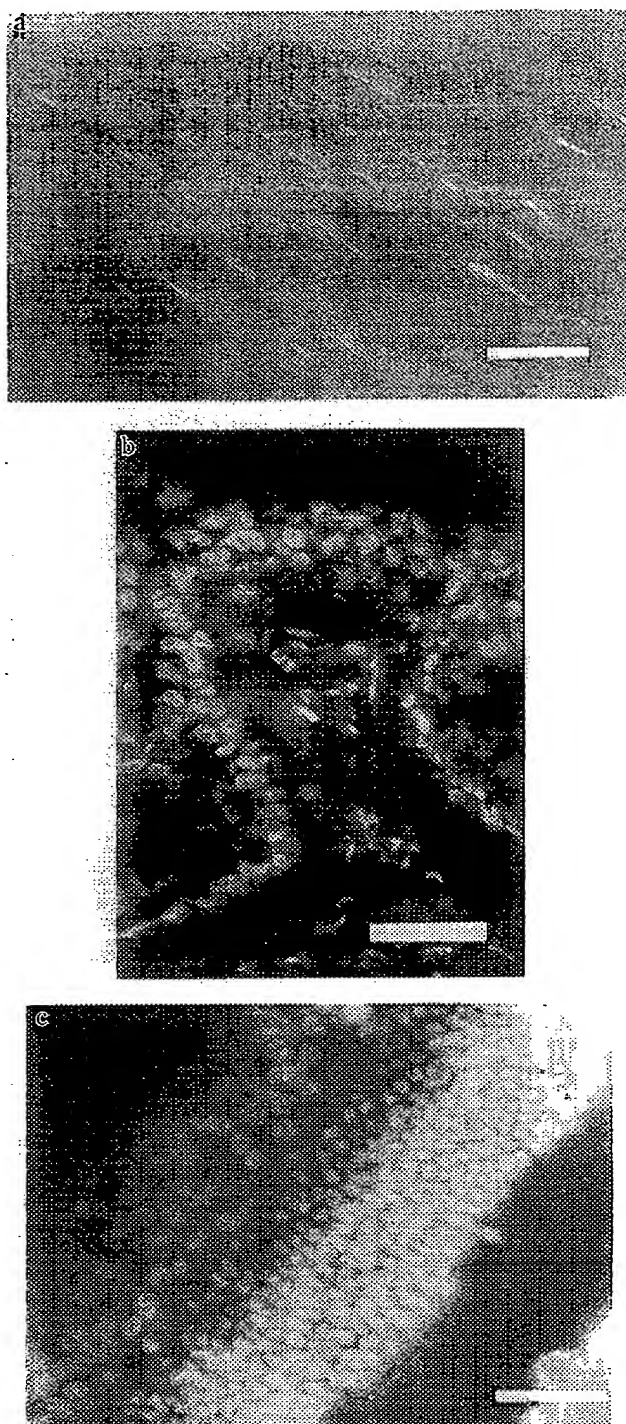


図 5 イオントホレーゼによる green fluorescent protein(GFP)発現プラスミド導入後の眼組織の凍結切片標本所見。

a: 角膜実質層に蛍光をみている。b: 毛様体上皮下組織に蛍光をみている。c: 網膜組織には蛍光がみられない。バーは 50  $\mu\text{m}$



投与例がある安全性の高いベクターである。Dunaief ら<sup>1)</sup>はレトロウイルスを感染させた網膜色素上皮を網膜下に注入することで、Kido ら<sup>2)</sup>はオプシプロモーターを用いることで、それぞれ生後間もないマウスの視細胞に遺伝子導入できたことを報告している。一般的にレトロウイルスベクターはいったん組み込まれると長期間遺伝子発現が期待できる一方で、遺伝子導入効率が必ずしも高くなくことや、分裂中の細胞にしか導入できないなどの問題点があるとされている。アデノウイルスベクターは静止期の細胞であっても効率よく遺伝子を導入できるのが特徴で、Abraham ら<sup>3)</sup>は heme oxygenase-1 遺伝子をアデノウイルスベクターに組み込み、硝子体内注入することで、角膜内皮、虹彩、水晶体、網膜に遺伝子発現をみたし報告している。アデノウイルスベクターは一過性の発現ベクター系であることと、ウイルスそのものに対する中和抗体の出現による導入効率の減少が問題であるとされている。アデノ随伴ウイルスベクターはこれらのウイルスベクターの欠点を補うべく最近注目されているベクターであり、病原性がなく、染色体の特定部位への取り込み、非分裂細胞へも遺伝子導入が可能であるとされている。Flannery ら<sup>4)</sup>はアデノ随伴ウイルスベクターにオプシプロモーターを組み込み、網膜下に注入することで、注入部位の視細胞のほぼ 100% に遺伝子導入が可能であったと報告している。しかし一方で、組み換えアデノ随伴ベクターでは宿主染色体へ取り込まれる性質が保持されにくいことも指摘されており、また産生系がやや煩雑で高力価のウイルス液を得にくいなどの問題点もあるとされている。その他、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)ベクター、ヘルペスウイルスベクター、パピローマウイルスベクターなどが開発されてきている。これらのウイルスを使ったベクター系は、その性質が本来のウイルスの性質に依存するため、今後は目的とした疾患、標的臓器により使い分け、開発していく必要があるとされている。非ウイルスベクターとしては正電荷リポソームを使ったものが挙げられるが、組織によっては導入効率が非常に悪かったり、細胞毒性が強いなどの欠点が指摘されている。しかし最近、リポソームと不活化されたセンダイウイルスとを融合させ、膜融合リポソームを作製する方法が考案され、高い導入効率と低い毒性から注目されている。Hangai ら<sup>5)</sup>は S オリゴをこの膜融合リポソームに封入し、マウスの硝子体内に注入することで網膜組織に導入できたことを報告している。このように、現在の遺伝子導入技術はそれぞれ長所と短所があるものの日々進化しており、将来の眼科遺伝子治療に向けて、より安全で確実な方法の開発が待たれている。

今回行ったイオントホレーゼは、種々の電荷を帯びた薬剤を能動的に眼内に移行させる方法である。特別なベクターを必要とせず、安価で簡便であるために繰り返し行うことができ、能動輸送であるため導入される細胞

を選ばないのが特徴である。

眼科領域での応用としては、主に 1980 年代に抗生物質の眼内、特に硝子体内移行を効率よくする方法として報告<sup>6)~12)</sup>されているが、それ以外の薬物でも報告があり、Grossman ら<sup>13)</sup>はケトコナゾールの、Lam ら<sup>14)</sup>はデキサメサゾンのイオントホレーゼを行い、硝子体や網脈絡膜への移行が結膜下注射や球後注射に比べて極めて良好であり、治療に必要な薬物濃度を長時間維持できたと報告している。核酸をこの方法で生体内に導入する試みがなされ始めたのは最近のことであり、ほとんどがオリゴヌクレオチドの導入の試みである。眼科領域では調べた限りでは報告されていないが、他の領域で Robinson ら<sup>15)</sup>が帯電したバルーンカテーテルを用いて、豚の大動脈にアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入し得たと報告している。また、Geest ら<sup>16)</sup>はヌクレオチドの導入に際して、生体内酵素の分解を受けたことを報告している。

核酸と細胞はいずれも負に帯電しているために、そのままでは遺伝子を細胞中に導入しにくい。しかし、正電極を対極にすることで眼内に向かう電流によって移行することが期待できる。そこで、今回の実験では蛍光標識した S オリゴおよび GFP を発現する 4.7 kbp のプラスミドをイオントホレーゼにより非侵襲的に眼内に導入し、蛍光顕微鏡と蛍光 DNA シーケンサを用いて、その眼内動態ならびに遺伝子発現状況を観察、検討した。

使用したオリゴヌクレオチドは自動合成機で合成したが、今回の実験では生体に導入するために、天然型オリゴヌクレオチドのままでは生体内酵素による加水分解をより強く受けるのではないかと考えられたので、ホスホロチオエート型の S オリゴを用いた。この S オリゴは天然型に比べ、細胞に取り込まれやすく、生体内酵素による加水分解を受けにくいという性質と、標的 RNA との結合性の強さおよび標的部位の塩基配列認識性の確かさに加えて、RNA/S オリゴハイブリッド形成が生じたときの RNaseH 活性による RNA 鎖切断が生じるなどの理由から注目を集めている分子である。

イオントホレーゼによる導入開始後、S オリゴは 5 分以内に角膜を通過して前房中に達し、10 分程度で硝子体中および周辺部網膜組織に到達していた。また、15 分後には後極部網膜組織にも到達していた。DNA シーケンサの泳動像から、導入に用いた S オリゴと前房中、硝子体中から採取したものは同じ分子量と考えられ、泳動像の波形も同一であることから、角膜を始めとした眼組織を通過する際に S オリゴは分解され難く、眼組織内でアンチセンス効果を十分に発揮できる可能性があると考えられた。また、点眼により S オリゴを投与したものでは眼内から検出できなかったことから、S オリゴはイオントホレーゼにより眼内への移行が促進されたと思われる。

経角膜的な今回のイオントホレーゼでは、通電部位である角膜の混濁や浮腫は認められず、他の眼組織にも炎

症所見や変性所見をみなかったが、Yoshizumi ら<sup>17)</sup>は経強膜的方法において通電部位に1~3 mmの網脈絡膜熱傷があったことを報告している。また、Lam ら<sup>18)</sup>は5分以上の通電を行うと、網膜色素上皮の壊死や外節の消失、内外顆粒層の非薄化、さらにはグリア膜の形成を来したと報告している。熱傷については、眼内に導入する薬剤溶液をアイカップに入れ、その中に電極を入れて眼球には非接触とすることで、ある程度避けられるのではないかと考えられた。また、対極も同様にして背部に設置し、眼球の後極部から離すことで後極部網膜組織への影響を減らせるのではないかと考えられたが、これについては今後より詳細に、また長期的に検討する必要があると思われる。

プラスミドはオリゴヌクレオチドに比べ遥かに分子量は大きく、今回の実験では明らかな網膜への導入は確認できなかった。しかし、角膜、隅角、毛様体上皮下組織にはGFPの発現を示す蛍光を確認できた。このことから、20分程度の通電によりプラスミドは角膜を通過し得ると考えられ、さらに、前房水の流れに乗り隅角組織に集積すると考えられる。また、網膜組織に蛍光がないにもかかわらず、毛様体上皮下組織に蛍光を確認できたのは、隅角からぶどう膜強膜流に乗り組織に到達し、遺伝子発現したためではないかと考えられる。強膜組織にも比較的強い蛍光があったが、強膜は自発蛍光が強いため、GFPとの蛍光を区別するのは困難であった。しかし、前述の理由から強膜組織にも発現している可能性は十分あると思われる。網膜へ導入できなかったのは、今回使用したプラスミドはオリゴヌクレオチドにおけるホスホロチオエート化処理のように、生体内酵素に対する安定化の処理をしておらず、このために網膜組織に到達できずに分解されたのではないかと考えられる。

今回の実験では、オリゴヌクレオチドに加えて、プラスミドレベルの比較的大きな遺伝子もイオントホレーゼにより眼組織に導入できる可能性が推定された。オリゴヌクレオチドは疾患を引き起こす基になる標的遺伝子の発現を抑制する、いわゆるアンチセンス療法に主に用いられる。Robinson ら<sup>19)</sup>は血管内皮増殖因子(VEGF)mRNAに対するアンチセンスオリゴを増殖性網膜症モデルマウスの硝子体内に直接注入し、網膜血管新生をある程度抑制し得たことを報告している。オリゴヌクレオチドによるアンチセンス療法は効果が一時的であると考えられる。このため、将来的には、この報告のように一部の血管新生疾患や、さらには感染症や急性ぶどう膜炎など比較的経過が短い疾患のうち、病態を引き起こしている物質の遺伝子発現を一時的に抑制することが非常に効果的であると考えられるものにまず応用される可能性が高いと考えられる。持続した効果を得るためには、オリゴヌクレオチドを投与し続ける必要があると考えられるが、イオントホレーゼは他の遺伝子導入法に比

べて簡便で、しかも安価に施行できるため繰り返して行える利点がある。このため、糖尿病網膜症のような慢性疾患においても、ある程度有効性を発揮できる可能性はあるのではないかと考えられる。今後は、この方法による標的遺伝子発現抑制効果およびその持続期間、長期投与による眼組織障害の程度などについて詳しく検討していく必要があると思われる。

一方、プラスミドを導入できれば、種々の遺伝子を組み込み細胞内で発現させることができ、アンチセンス法以外に、特定の遺伝子の欠落を補うことで、角膜や網膜の変性疾患などに応用できる可能性があると思われる。このような場合も長期間にわたる投与であるので、イオントホレーゼは適した方法と思われる。今回の実験では眼内での分解が疑われ、網膜組織に導入できなかったが、プラスミド自体をホスホロチオエート化することはできないため、今後はプラスミドが眼内で安定するためのベクターを含めた工夫と、大分子量で長時間の通電が必要なことから、眼組織保護のための電極装置や取り付け部位などを含め、通電効率の工夫が必要と思われる。さらに、プロモーターの工夫などで特定の組織のみで発現させ得るかなどについても検討していきたい。

## 文 献

- 1) Dunaief JL, Kwun RC, Bhardwaj N, Lopez R, Gouras P, Goff SP: Retroviral gene transfer into retinal pigment epithelial cells followed by transplantation into rat retina. *Hum Gene Ther* 6: 1225-1229, 1995.
- 2) Kido M, Rich KA, Lang G, Barron E, Kohn DB, al Ubaidi MR, Blanks JC: Use of retroviral vector with an internal opsin promoter to direct gene expression to retinal photoreceptor cells. *Curr Eye Res* 15: 833-844, 1996.
- 3) Abraham NG, da Silva JL, Lavrovsky Y, Stoltz RA, Kappas A, Dunn MW, Schwartzman ML: Adenovirus-mediated heme oxygenase-1 gene transfer into rabbit ocular tissues. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36: 2202-2210, 1995.
- 4) Flannery JG, Zolotukhin S, Vaquero MI, LaVail MM, Muzyczka N, Hauswirth WW: Efficient photoreceptor-targeted gene expression *in vivo* by recombinant adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci* 94: 6916-6921, 1997.
- 5) Hangai M, Tanihara H, Honda Y, Kaneda Y: *In vivo* delivery of phosphorothioate oligonucleotides into murine retina. *Arch Ophthalmol* 116: 342-348, 1998.
- 6) 牧野圭祐, 水口雅嗣, 東海林洋子: 標識オリゴヌクレオチドによるアンチセンス分子の動的解析. 蛋白質核酸酵素 40: 1371-1377, 1995.
- 7) 村上 章: アンチセンスオリゴヌクレオチドの分子設計. 蛋白質核酸酵素 40: 1364-1369, 1995.

- 8) 早川芳宏, 広瀬雅朗, 片岡正典: 磷酸部位を修飾した核酸の合成. 蛋白質核酸酵素 40:1306—1314, 1995.
- 9) 松倉 誠: アンチセンス分子による遺伝子発現の制御. 蛋白質核酸酵素 40:1378—1382, 1995.
- 10) Barza M, Peckman C, Baum J: Transscleral iontophoresis of cefazolin, ticarcillin, and gentamicin in the rabbit. Ophthalmology 93:133—139, 1986.
- 11) Choi TB, Lee DA: Transscleral and transcorneal iontophoresis of vancomycin in rabbit eyes. J Ocul Pharmacol 4:153—164, 1988.
- 12) Fishman PH, Jay WM, Rissing JP, Hill JM, Shockley RK: Iontophoresis of gentamicin into aphakic rabbit eyes. Sustained vitreal levels. Invest Ophthalmol Vis Sci 25:343—345, 1984.
- 13) Grossman R, Lee DA: Transscleral and transcorneal iontophoresis of ketoconazole in the rabbit eye. Ophthalmology 96:724—729, 1989.
- 14) Lam TT, Edward DP, Zhu XA, Tso MOM: Transscleral iontophoresis of dexamethasone. Arch Ophthalmol 107:1368—1371, 1989.
- 15) Robinson KA, Chronos NA, Schieffer E, Palmer SJ, Cipolla GD, Milner PG, et al: Pharmacokinetics and tissue localization of antisense oligonucleotides in balloon-injured pig coronary arteries after local delivery with an iontophoretic balloon catheter. Cathet Cardiovasc Diagn 41:354—359, 1997.
- 16) Geest R, Hueber F, Szoka FC Jr, Guy RH: Iontophoresis of bases, nucleosides, and nucleotides. Pharmacol Res 13:553—558, 1996.
- 17) Yoshizumi MO, Lee DA, Sarraf DA, Equi RA, Verdon W: Ocular toxicity of iontophoretic foscarnet in rabbits. J Ocul Pharmacol Ther 11:183—189, 1995.
- 18) Lam TT, Fu J, Tso MOM: A histopathologic study of retinal lesions inflicted by transscleral iontophoresis. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 229:389—394, 1991.
- 19) Robinson GS, Pierce EA, Rock SL, Foley E, Webb R, Smith LE: Oligodeoxynucleotides inhibit retinal neovascularization in a murine model of proliferative retinopathy. Proc Natl Acad Sci 93:4851—4856, 1996.